

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

REC'D 13 MAR 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**DOCUMENT DE PRIORITÉ****COPIE OFFICIELLE**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **20 JAN. 2000**Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**SIEGE**26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **17 FEV 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9901917**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **17 FEV. 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS**

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
203111 003111 472 01 45 00 92 02

2 **DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle**

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale
☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n° date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie associée à un antigène dans une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse cytotoxique antivirale, antiparasitaire ou antitumorale

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

PIERRE FASRE MEDICAMENT

Forme juridique

SOCIÉTÉ ANONYME

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

43, place Abel Sanco 31100 SOULOGNE

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 **DIVISIONS** antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

92469

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 01917

TITRE DE L'INVENTION :

Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie associée à un antigène dans une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse cytotoxique antivirale, antiparasitaire ou antitumorale

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

PIERRE FABRE MEDICAMENT

45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

RENNO Toufic
Les Coulerins B1
74580 Viry, FR

LB/CA

ROMERO Pedro
Chemin du Polny 1
1066 Epalinges, CH

CO

MICONNET Isabelle
Chemin de Chandolin 5
1005 Lausanne, CH

CEROTTINI Jean-Charles
Avenue du Léman 12
1025 Saint Sulpice, CH

CH -

BONNEFOY Jean-Yves
Les Noyers
74350 Le Sappey, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

12 mars 1999

CABINET REGIMBEAU

L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA d'entérobactérie, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, associée à un antigène ou un haptène pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre un agent infectieux ou une cellule tumorale. L'invention comprend l'utilisation de ces composés pour la prévention et le traitement d'infection ou du cancer, notamment les cancers associés à un antigène tumoral tels que les mélanomes, ainsi que des compositions pharmaceutiques comprenant certains de ces composés.

La vaccination est un moyen efficace de prévenir ou de réduire les infections virales ou bactériennes. Le succès des campagnes de vaccination dans ces domaines a permis d'étendre le concept de vaccin jusqu'alors utilisé dans le domaine de l'infectiologie aux domaines du cancer et des maladies auto-immunes. Les antigènes vaccinaux administrés seuls chez l'hôte ne sont souvent pas assez immunogéniques pour induire une réponse immunitaire, et doivent donc être associés à un adjuvant ou couplés à une protéine porteuse pour induire (ou augmenter) leur immunogénicité. Dans ces conditions, seule une réponse immune de type humorale peut être induite. Or, dans le cadre d'une thérapie antivirale, la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) capables de reconnaître et de détruire le virus est de toute importance (Bachmann et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24, 2228-2236 ; Borrow P., 1997, J. Virol. Hepat., 4, 16-24), comme l'attestent de nombreuses études montrant, *in vivo*, le rôle protecteur des réponses dirigées contre les épitopes viraux (Arvin AM, 1992, J. Inf. Dis., 166, S35-S41 ; Koszinowski et al., 1987 Immunol. Lett., 16, 185-192).

L'importance des réponses CTL a aussi été fortement documentée dans les réponses antitumorales notamment celles dirigées contre les cellules de mélanome (revue dans Rivoltini et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18, 55-63). Le ou les épitopes CTL (séquences peptidiques interagissant avec les molécules de classe I et présentés aux lymphocytes T CD8+) ont été définis pour plusieurs antigènes. Cependant, la difficulté réside dans la génération de CTL *in vivo*, due à la faible immunogénicité de ces peptides (Melief, 1992, Adv. Cancer Res., 58, 143-175 ; Nandaz et Sercarz, 1995, Cell, 82, 13-17).

Des recherches s'orientent par conséquent vers l'identification de nouveaux adjuvants, ou de système de délivrance d'antigènes («delivery system»), permettant d'induire des CTL. Grâce à leur efficacité à présenter les antigènes et à stimuler le système immunitaire, les cellules dendritiques, par exemple, ont été utilisées pour
 5 générer des réponses CTL antivirales (Ludewig B et al., 1998, J. Virol., 72, 3812-3818 ; Brossard P. et al., 1997, J. Immunol., 158, 3270-3276) ou anticancéreuses (Nestle F.O. et al., 1998, Nat. Med., 4, 328-332). Les approches ont consisté à charger les cellules dendritiques *ex vivo* avec l'antigène d'intérêt (peptides ou lysat cellulaire) et réimplanter ces cellules chez le patient. D'autres approches consistent à
 10 transférer *ex vivo* les cellules dendritiques avec le gène codant pour l'antigène d'intérêt et à réinjecter ces cellules transfectées (Gilboa E. et al., 1998, Cancer Immunol. Immunother., 46, 82-87). Ces approches ont été utilisées avec succès chez la souris et récemment chez l'homme (Hsu F.J. et al., 1996, Nat. Med., 2, 52-58) mais restent néanmoins complexes dans la mesure où ces cellules doivent être traitées
 15 *ex vivo* (transformation des cellules ou internalisation des antigènes) et transplantées dans l'organisme hôte. De même, l'utilisation de particules de type viral (Layton G.T. et al., 1993, J. Immunol., 151, 1097-1107) ou de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) (Valmori et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1458-1462) permet de générer des réponses CTL. Toutefois, une vaccination antivirale ou antitumorale réalisée avec des
 20 peptides correspondant à des épitopes CTL et en présence d'un tel adjuvant peuvent conduire à un état de tolérance spécifique qui peut conduire dans certains cas à l'effet contraire recherché, c'est-à-dire à une diminution de la réponse immune (Toes et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 7855-7860).

Ainsi, il existe aujourd'hui un grand besoin de disposer d'un composé qui,
 25 associé à une molécule, notamment un antigène ou haptène, soit capable de générer des CTL dirigés contre ladite molécule. Un tel composé pourrait en particulier être utilisé pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à induire une protection immunitaire de type CTL antiviral, antibactérien, antifongique ou antiparasitaire, ou antitumoral.

30 De manière surprenante, il a été mis en évidence qu'une protéine de la membrane externe de bactérie à gram négatif, notamment une protéine OmpA

d'entérobactérie telle que la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* (protéine décrite dans WO 95/27787 et WO 96/14415), a la propriété d'éluciter une réponse CTL contre une molécule qui lui est associée de manière covalente ou non, de préférence sans recours à l'addition d'un autre adjuvant.

5 Ainsi, la présente invention est relative à l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, d'un de ses fragments ou d'une séquence nucléique codant pour ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou à accroître une réponse T cytotoxique contre un agent infectieux ou une cellule tumorale, *in vitro* ou *in vivo*, de préférence *in vivo*,
10 ainsi que pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou à accroître ladite réponse T cytotoxique.

Dans la présente invention, on entendra désigner par le terme « protéine » également les peptides ou les polypeptides et par le terme « OmpA » (pour « Outer Membrane Protéin »), les protéines de la membrane externe de type A.

15 Par fragment d'une protéine OmpA, on entend désigner en particulier tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine OmpA qui, lorsqu'il est associé à un antigène ou haptène spécifique d'un agent infectieux ou d'une cellule tumorale, est capable de générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale,
20 ledit fragment de la protéine OmpA comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence au moins 10 acides aminés ou de manière plus préférée au moins 15 acides aminés.

Par « antigène ou haptène spécifique d'un agent infectieux ou d'une cellule tumorale », on entend désigner en particulier tout composé exprimé par un agent
25 infectieux, tel qu'un virus, une bactérie, une levure, un champignon ou un parasite, par une cellule tumorale, ou un de leurs analogues structuraux, qui seul ou en association avec un adjuvant de l'immunité est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique dudit agent infectieux ou de ladite cellule tumorale.

Par analogue d'un antigène ou haptène, on entend désigner en particulier dans
30 la présente description un composé présentant une analogie structurale avec ledit antigène ou haptène capable d'induire une réponse immunologique dirigée contre ledit

antigène ou haptène dans un organisme préalablement immunisé avec ledit composé analogue.

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre, associé à ladite protéine OmpA d'entérobactérie, un antigène ou un haptène spécifique dudit agent infectieux ou de ladite cellule tumorale.

De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit agent infectieux est une particule virale, une bactérie, une levure, un champignon ou un parasite.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

Les procédés d'extraction de protéines de membrane bactériennes sont connus de l'homme de l'art et ne seront pas développés dans la présente description. On peut citer par exemple, mais sans s'y limiter le procédé d'extraction décrit par Haeuw J.H. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

Les méthodes de préparation de protéines recombinantes sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description, on pourra néanmoins se référer à la méthode décrite dans les exemples. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifère

(Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4:558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre par exemple des baculovirus (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4:564-572).

De manière tout à fait préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

En particulier, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80, de préférence 90 %, avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

Par séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec une séquence d'acides aminés déterminée, on entend désigner une séquence qui après alignement avec ladite séquence déterminée comprend au moins 80 % d'acides aminés en commun avec ladite séquence déterminée.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est choisi parmi les protéines, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides ou tout composé capable de diriger spécifiquement la réponse CTL contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé ou mélangé avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé par liaison covalente, notamment par couplage chimique, avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

Dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit antigène ou haptène pour faciliter le couplage chimique, de préférence, ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison, notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit antigène ou haptène. Le couplage covalent entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit antigène ou haptène selon l'invention peuvent être réalisés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, choisie pour effectuer le couplage et de la nature dudit antigène ou haptène à coupler.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que le couplage entre ledit antigène ou haptène et ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est réalisé par recombinaison génétique, lorsque ledit antigène ou haptène est de nature peptidique.

Les conjugués issus d'un couplage à ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, peuvent être préparés par recombinaison génétique. La protéine chimérique ou hybride (conjugué) peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, d'une séquence codant pour ledit antigène ou haptène de nature protéique.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (Gene expression technology, Methods in Enzymology, vol. 185, 3-187, 1990).

Sous un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride, ou comprend un vecteur contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride ou une cellule hôte transformée contenant ladite construction nucléique capable d'exprimer ladite protéine hybride.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à éliminer les agents infectieux ou à inhiber la croissance de tumeurs.

De préférence, l'utilisation selon l'invention est relative à la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les maladies infectieuses ou les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral.

Parmi les cancers dont les tumeurs expriment un antigène tumoral associé pouvant être prévenus ou traités par les utilisations selon la présente invention, on peut citer en particulier, mais sans s'y limiter :

- le cancer du sein, du poumon, du colon, et le carcinome gastrique (Kawashima et al., 1999, cancer Res. 59:431-5) ;
- le mésothéliome, l'ostéosarcome, les cancers du cerveau (Xie et al., 1999, J. Natl. Cancer. Inst. 91:169-75) ;
- le mélanome (Zheuten et al., 1998, Bratisl. Lek. Listy 99:426-34) ;
- l'adénome cystique du pancréas (Hammel et al., 1998, Eur. J. gastroenterol. Hepatol. 10:345-8) ;
- le cancer colorectal (Ogura et al., 1998, Anticancer Res. 18:3669-75) ;
- le carcinome des cellules rénales (Jantzer et al., 1998, Cancer Res. 58:3078-86) ;
- et
- le cancer de l'ovaire et du cervix (Sonoda et al., 1996, Cancer. 77:1501-9).

L'invention a en particulier pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse, notamment d'origine virale, bactérienne ou fongique, ou parasitaire, ou un cancer, de préférence associé à un antigène tumoral, en particulier les mélanomes.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, notamment sous la forme d'un liposome.

5 De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit véhicule est un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine
10 hybride.

Sous un dernier aspect, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite construction nucléique, ou la construction nucléique contenue dans ledit vecteur ou ladite cellule hôte transformée, comprend une séquence nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID N° 1, l'un de ses fragments présentant au
15 moins 15 nucléotides, de préférence 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N° 1, ou une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec l'une desdites séquences.

Par séquence nucléique d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec une séquence nucléique déterminée, on entend désigner une séquence qui
20 après alignement avec ladite séquence déterminée comprend au moins 80 % de nucléotides en commun.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

25 **Légendes des figures :**

Figures 1A, 1B, 1C et 1D : Mesure de l'activité CTL de cellules effectrices

Après immunisation avec 50 μ g hELA mélangé avec 3 μ g rP40 (figure 1A), 50 μ g hELA mélangé avec 300 μ g rP40 (figure 1B), 50 μ g hELA couplé à rP40 (figure 1C), ou 50 μ g du peptide TRP-2 mélangé avec 300 μ g rP40 (figure 1D), les
30 cellules de ganglions drainants sont stimulées avec des cellules EL-4 A2/Kb (figures 1A, 1B, 1C) ou EL-4 (figure 1D) irradiées et pré-pulsées avec 1 μ M du peptide

relevant avant d'être évaluées pour leur capacité à tuer des cellules cibles pré-pulsées (rectangle) ou non (losange) avec le peptide relevant.

Les abscisses des repères des figures 1A à 1D correspondent au rapport des cellules T effectrices (lymphocytes activés) mises en présence sur les cellules cibles (EL-4 A2/Kb ou EL-4).

Exemple 1 : Clonage du gène codant pour la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*

Le gène codant pour la protéine P40 a été obtenu par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de *Klebsiella pneumoniae* IP I145 (Nguyen et col., Gene, 1998). Le fragment de gène codant de ce gène est inséré dans divers vecteurs d'expression sous contrôle de différents promoteurs, en particulier celui de l'opéron Trp. La séquence nucléotidique et la séquence peptidique de la protéine P40 sont représentées par les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 ci-après. Une souche productrice *E. coli* K12, a été transformée par un vecteur d'expression pvaLP40. La protéine recombinante P40 (dénommée rP40) est produite sous forme de corps d'inclusion avec un rendement important (> 10 % en g de protéines/g de biomasse sèche).

Cet exemple n'est qu'une illustration de l'expression de la protéine rP40, celle-ci pouvant être étendue à d'autres souches bactériennes ainsi qu'à d'autres vecteurs d'expression.

Exemple 2 : Procédé de fermentation de protéines de fusion rP40

Dans un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) renfermant de l'Ampicilline (100 µg/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 µg/ml, Sigma) on inocule avec la souche *E. coli* transformée décrite ci-dessus. On incube pendant une nuit à 37°C puis, 200 ml de cette culture sont utilisés pour ensemer 2 litres de milieu de culture dans un fermenteur (Biolafitte, France). De manière assez classique, le milieu de culture peut être composé d'agents chimiques, supplémentés par les vitamines, des extraits de levure, connus pour favoriser une croissance de cellules bactériennes à densité élevée.

Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénation, l'alimentation de sources combinées (glycérol ou

glucose). De manière générale, le pH est réglé à 7,0, la température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant en glycérol (87 %) à un débit constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est déclenchée par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. La quantité de biomasse humide obtenue est d'environ 200 g.

Exemple 3 : Procédé d'extraction et de purification de la protéine rP40

10 Extraction de la rP40

Après centrifugation du bouillon de culture (4000 rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5. Les insolubles, ou corps d'inclusion, sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure à température ambiante sous agitation douce). Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl, 25 mM à pH 8,5 et 5 mM MgCl₂, puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

On solubilise les corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant 7 M urée (agent dénaturant) et 10 mM de dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000g) permet d'éliminer les particules non solubles.

On resuspend ensuite dans 13 X volumes de tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air (favoriser la renaturation de la protéine par dilution et réoxydation des ponts disulfures).

Purification de la protéine rP40

- Etape de chromatographie d'échange d'anions.

Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 X volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prop High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus, à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280 nm. La protéine rP40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de 0,2 M en NaCl dans le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,5 : 0,1 % Zwittergent 3-14.

- Etape de chromatographie d'échange de cations.

Les fractions contenant la protéine rP40 sont poolées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM, pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14. La protéine rP40 est éluée (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les profils électrophorétiques montrent un degré de pureté de l'ordre de 95 %. L'état de la protéine est suivi par SDS-PAGE. Selon sa forme dénaturée ou native, la protéine P40, extraite de la membrane de *Klebsiella pneumoniae*, possède un comportement électrophorétique (migration) caractéristique. La forme native (structure en feuillets β) présente en effet une masse moléculaire plus faible que la forme dénaturée (structure en hélices α) sous l'action d'un agent dénaturant, tel que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine, ou par chauffage à 100°C en présence de SDS. La protéine rP40 n'est pas correctement renaturée en fin de renaturation, que celle-ci soit réalisée en absence ou en présence de 0,1 % ; (p/v) Zwittergent 3-14. En revanche, une renaturation totale est obtenue après dialyse contre un tampon Tris/HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % (p/v) Zwittergent 3-14. Toutefois, il faut noter que cette renaturation n'est obtenue que, lorsque l'étape de dilution et le traitement à température ambiante, sont réalisés eux-mêmes en présence de Zwittergent 3-14 (résultats négatifs en absence de détergent).

Exemple 4 : génération de CTL anti-Melan-A après immunisation par rP40 mélangé à un peptide analogue au Melan-A

Le peptide hELA, utilisé dans les expériences ci-dessous, est l'objet du brevet LUD5483.2, propriété de l'Institut Ludwig de Recherche sur le Cancer. hELA est un analogue du décapeptide 26-35 (EAAGIGILTV) de Melan-A/MART-1, une protéine exprimée sur les mélanocytes et les mélanomes. Bien que le décapeptide 26-35 de Melan-A/MART-1 soit capable de se lier à la molécule HLA-A0201 (Romero et al., 1997, J. Immunol. 159, 2366-2374), il est faiblement immunogène in vitro et in vivo (Valmori et al., 1998, J. Immunol. 160, 1750-1758). L'analogue hELA a été généré par la substitution du second acide aminé du décapeptide 26-35 de Melan-A/MART-1 (une alanine) par une leucine. Le résultat de cette substitution, qui est basée sur une analyse des résidus nécessaire à l'ancrage des peptides à la molécule HLA-A0201, est une reconnaissance plus efficace par les CTL de patients de mélanome et une meilleure immunogénicité in vitro (Valmori et al., 1998, J. Immunol. 160, 1750-1758). Des souris transgéniques HLA-A* 0201/Kb (A2/Kb) de souche C57Bl/6 x BDA/2 (Vitiello et al., 1991, J. Exp. Med., 173, 1007-1015) ont été utilisées dans cette étude pour tester ELA. La molécule MHC de classe I exprimée chez ces souris est une molécule chimérique formée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule humaine HLA-A0201 (allotype le plus fréquemment retrouvé) et du domaine $\alpha 3$ de la molécule murine K^b.

Le peptide TRP-2 est un octapeptide correspondant aux acides aminés 181-188 (VYDFFVWL) de la tyrosinase-related protein 2 (TRP-2). TRP-2 est exprimé dans les mélanocytes et les mélanomes. Il a été démontré que cet antigène induit des réponses CTL protectrices du mélanome dans les souris C57BL/6 (H-2K^b) (Bloom et al., 1997, J. Exp. Med. 185, 453-459).

Protocole expérimental

Des souris A2/Kb ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue :

- 50 μ g ELA mélangés à 3 ou 300 μ g rP40 ;
- 50 μ g ELA couplés de façon covalente à 300 μ g rP40.

Des souris C57BL/6 ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue :

- 50 μ g du peptide TRP-2 (181-188) mélangés à 300 μ g rP40.

Génération de cellules cytotoxiques effectrices

10 jours après immunisation, les souris sont sacrifiées et les lymphocytes des ganglions drainant sont récupérés pour être stimulés in vitro avec le peptide relevant.

Ces lymphocytes ($4 \text{ à } 5 \cdot 10^6$) sont cultivés en plaque 24 puits en DMEM plus
 5 10 mM HEPES, 10 % SVF et 50 μM β -2-mercaptoéthanol avec $2 \text{ à } 5 \cdot 10^5$ cellules EL-4 A2/Kb ou EL4 irradiées (10 kRads) pré-pulsées 1 h à 37°C avec 1 μM du peptide relevant. Après deux stimulations hebdomadaires, les cellules sont testées pour leur activité cytotoxique.

Mesure de l'activité cytotoxique

10 Les cellules EL-4 A2/Kb ou EL4 sont incubées 1 h avec du ^{51}Cr en présence ou non du peptide relevant, lavées puis co-incubées avec les cellules effectrices à différents ratio en plaque 96 puits dans un volume de 200 μl pendant 4 à 6h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et le relargage de ^{51}Cr est mesuré dans 100 μl de surnageant. Le pourcentage de lyse spécifique est calculé comme suit :

15 $\% \text{ lyse spécifique} = (\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}) / (\text{relargage total} - \text{relargage spontané}) \times 100.$

Résultats

Comme le montrent les figures 1A à 1D, l'immunisation de souris avec une dose optimale de rP40 (300 μg) en mélange avec hELA (figure 1B) ou TRP-2 (figure
 20 1D) induit une forte réponse CTL spécifique. Une telle réponse est également observée après immunisation avec rP40 couplée à hELA (figure 1C). Par contre, l'immunisation avec le peptide seul ou rP40 seule (résultats non montrés) ou avec le peptide hELA en mélange avec une dose sous-optimale de rP40 (3 μg) n'induit aucune activité CTL (figure 1A). Ces résultats démontrent que la molécule rP40 mélangée ou
 25 couplée à des peptides immunogènes permet d'induire une réponse CTL spécifique in vivo, et ce sans l'ajout d'adjuvant.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- 5 (A) NOM: PIERRE FABRE MEDICAMENT
(B) RUE: 45 PLACE ABEL GANCE
(C) VILLE: BOULOGNE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92100 CEDEX

- 10 (ii) TITRE DE L' INVENTION: UTILISATION D'UNE PROTEINE OMPA
D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE A UN ANTIGENE DANS UNE
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE DESTINEE A GENERER OU
ACCROITRE UNE REPONSE CYTOTOXIQUE ANTIVIRALE,
ANTIPARASITAIRE OU ANTITUMORALE.

- 15 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
20 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1035 paires de bases
25 (B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

- 30 (A) ORGANISME: *Klebsiella pneumoniae*

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: exon
(B) EMPLACEMENT: 1..1032

(ix) CARACTERISTIQUE:

- 35 (A) NOM/CLE: intron
(B) EMPLACEMENT: 1033..1035

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..1032

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

	ATG AAA GCA ATT TTC GTA CTG AAT GCG GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG	48
	Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp	
5	1 5 10 15	
	TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC	96
	Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe	
	20 25 30	
	TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC GGT CCG ACC CGT AAC GAT CAG	144
10	Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln	
	35 40 45	
	CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC CAG GTT AAC CCG TAC CTC GGT	192
	Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly	
	50 55 60	
15	TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC CGT ATG GCA TAT AAA GGC AGC	240
	Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser	
	65 70 75 80	
	GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA	288
	Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys	
20	85 90 95	
	CTG GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC	336
	Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly	
	100 105 110	
	GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC	384
25	Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly	
	115 120 125	
	GTT TCC CGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC	432
	Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly	
	130 135 140	
30	GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC	480
	Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr	
	145 150 155 160	
	CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT	528
	Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro	
35	165 170 175	
	GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT TCC TAC CGC TTC GGT CAG GAA	576
	Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu	
	180 185 190	
	GAT GCT GCA CCG GTT GTT GCT CCG GCT CCG GCT CCG GCT CCG GAA GTG	624

	Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	
	195							200					205				
	GCT	ACC	AAG	CAC	TTC	ACC	CTG	AAG	TCT	GAC	GTT	CTG	TTC	AAC	TTC	AAC	672
	Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn	
5	210						215					220					
	AAA	GCT	ACC	CTG	AAA	CCG	GAA	GGT	CAG	CAG	GCT	CTG	GAT	CAG	CTG	TAC	720
	Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr	
	225					230					235				240		
	ACT	CAG	CTG	AGC	AAC	ATG	GAT	CCG	AAA	GAC	GGT	TCC	GCT	GTT	GTT	CTG	768
10	Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu	
					245						250				255		
	GGC	TAC	ACC	GAC	CGC	ATC	GGT	TCC	GAA	GCT	TAC	AAC	CAG	CAG	CTG	TCT	816
	Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	
					260					265				270			
15	GAG	AAA	CGT	GCT	CAG	TCC	GTT	GTT	GAC	TAC	CTG	GTT	GCT	AAA	GGC	ATC	864
	Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile	
			275					280					285				
	CCG	GCT	GGC	AAA	ATC	TCC	GCT	CGC	GGC	ATG	GGT	GAA	TCC	AAC	CCG	GTT	912
	Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val	
20		290					295					300					
	ACT	GGC	AAC	ACC	TGT	GAC	AAC	GTG	AAA	GCT	CGC	GCT	GCC	CTG	ATC	GAT	960
	Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	
	305					310					315			320			
	TGC	CTG	GCT	CCG	GAT	CGT	CGT	GTA	GAG	ATC	GAA	GTT	AAA	GGC	TAC	AAA	1008
25	Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys	
					325					330				335			
	GAA	GTT	GTA	ACT	CAG	CCG	GCG	GGT	TAA								1035
	Glu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Gly	*								
					340												

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 344 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

35

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp

1

5

10

15

	Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	
	20						25						30				
	Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	
	35						40						45				
5	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	
	50						55						60				
	Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
	65						70						80				
	Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	
10	85						90						95				
	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	
	100						105						110				
	Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	
	115						120						125				
15	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	
	130						135						140				
	Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	
	145						150						155				
	Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	
20	165						170						175				
	Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu	
	180						185						190				
	Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	
	195						200						205				
25	Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn	
	210						215						220				
	Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr	
	225						230						235				
	Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu	
30	245						250						255				
	Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	
	260						265						270				
	Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile	
	275						280						285				
35	Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val	
	290						295						300				
	Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	
	305						310						315				
													320				

Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys

325

330

335

Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly

340

REVENDICATIONS

1/ Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer
5 ou accroître une réponse T cytotoxique contre un agent infectieux ou une cellule tumorale.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre, associé à ladite protéine OmpA d'entérobactérie, un antigène ou un haptène spécifique dudit agent infectieux ou de
10 ladite cellule tumorale.

3/ Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ledit agent infectieux est une particule virale, une bactérie ou un parasite.

4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un
15 procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

6/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que
20 ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

7/ Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins
25 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

8/ Utilisation selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est choisi parmi les peptides, les lipopeptides, les
30 polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides ou tout

composé capable de diriger spécifiquement la réponse CTL contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale.

5 9/ Utilisation selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé ou mélangé avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

10 11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage réalisé par synthèse chimique.

12/ Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit antigène ou haptène pour faciliter le couplage chimique.

15 13/ Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

20 14/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le couplage entre ledit antigène ou haptène et ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est réalisé par recombinaison génétique lorsque ledit antigène ou haptène est de nature peptidique.

15/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride.

25 16/ Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que ladite construction nucléique est contenue dans un vecteur, ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine hybride.

17/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à éliminer les agents infectieux ou à inhiber la croissance de tumeurs.

18/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les maladies infectieuses comprenant les infections virales, bactériennes, fongiques et parasitaires.

19/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17, pour la préparation
5 d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers.

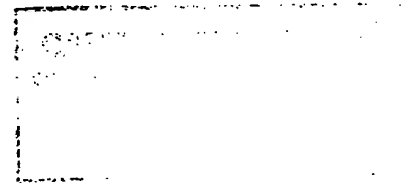
20/ Utilisation selon la revendication 19, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers associés à un antigène tumoral.

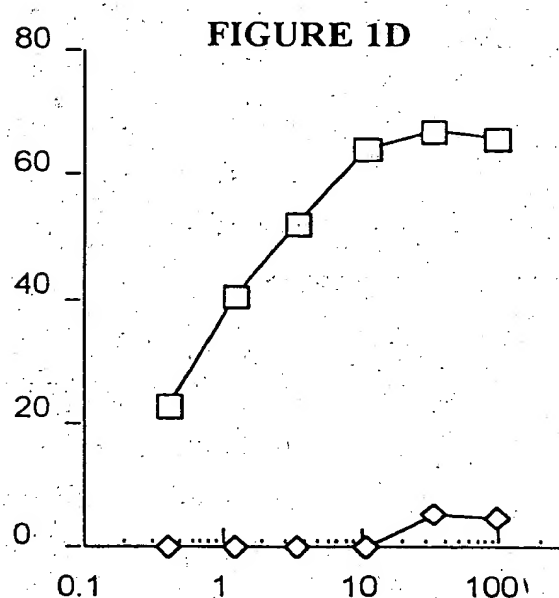
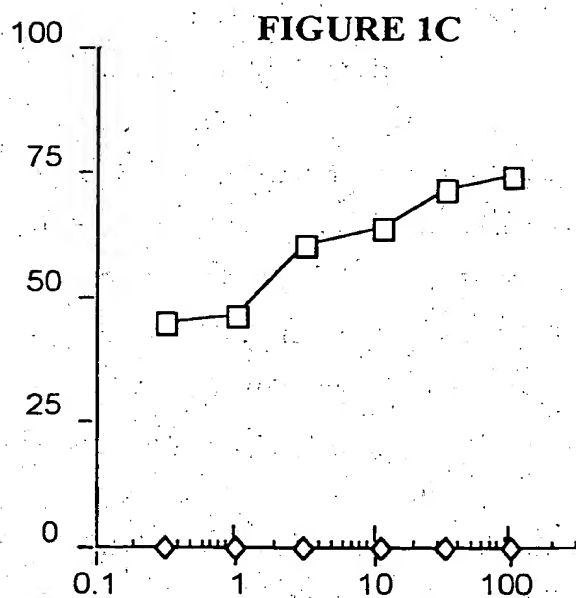
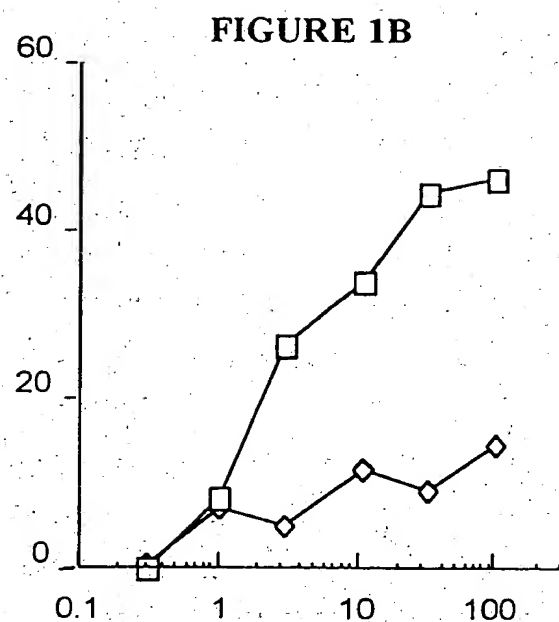
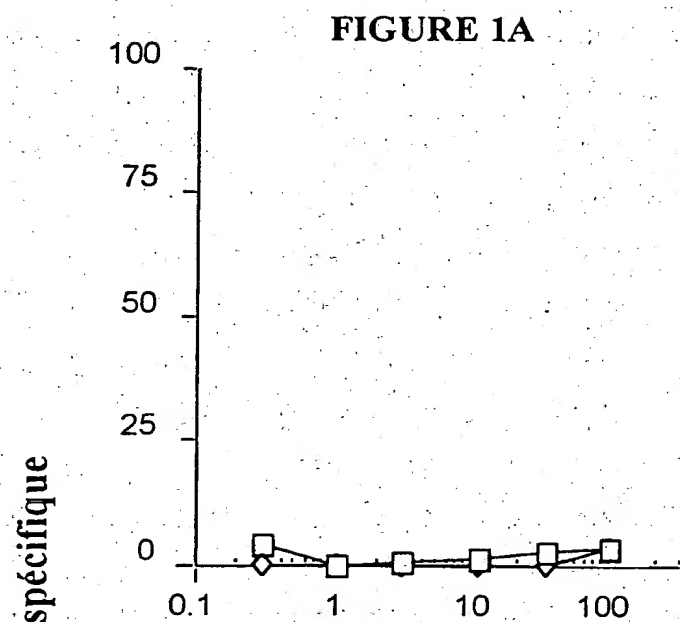
21/ Utilisation selon les revendications 19 et 20, pour la préparation d'une
10 composition pharmaceutique destinée à prévenir les mélanomes.

22. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

23/ Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit
15 véhicule est un liposome, un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride.

20 24/ Utilisation selon l'une des revendications 15, 16 et 23, caractérisée en ce que ladite construction nucléique ou la construction nucléique contenue dans ledit vecteur ou ladite cellule hôte transformée, comprend une séquence nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID N° 1, l'un de ses fragments présentant au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N° 1, ou une séquence présentant une
25 homologie d'au moins 80 % avec l'une desdites séquences.





Rapport cellules effectrices sur cellules cibles